

Laborkurs des Heidelberger Life-Science Lab und des iGEM-Teams Heidelberg 2014

2. Woche/14.–16.07.2014

Tag 1

PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) ermöglicht die selektive Amplifikation von DNA-Sequenzen *in vitro*. Dazu wird eine Matrizen-DNA, zwei passende Oligonukleotide („Primer“), eine thermostabile DNA-Polymerase, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) sowie der entsprechende Reaktionspuffer benötigt. Die Primer werden so gewählt, dass sie mit der Matrizen-DNA hybridisieren, wobei einer der Primer an einen und der andere am anderen Matrizenstrang bindet. Ein Thermocycler ermöglicht verschiedene Reaktionsschritte bei jeweils optimalen Temperaturen: Denaturierung (94 °C), Annealing (je nach Primer ca. 50 °C bis 70 °C) und Elongation (je nach Polymerase 68 °C bis 72 °C). Der Denaturierungsschritt dient der Trennung der beiden Matrizen-Stränge durch Hitze. Während des Annealings wird die Temperatur wieder gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Matrize kommt. Die Elongationsphase schließlich findet beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase statt. Die Polymerase verlängert die 3'-Enden der Primer, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Matrize entspricht. In einer Art Kettenreaktion verdoppelt sich so die Zahl des PCR-Produktes bei jedem Zyklus.

Die hier verwendeten Primer amplifizieren das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) von einem Plasmid. Zusätzlich tragen sie einen Überhang am 5'-Ende, der BsaI-Restriktionsschnittstellen beinhaltet, die für die anschließende Klonierung des PCR-Produktes benötigt wird.

Pipettierschema

Komponente	Anfangs-konzentration	End-konzentration	Konstrukt	Negativ-kontrolle
Forward Primer	10 µM	0.5 µM	2,5 µl	2,5 µl
Reverse Primer	10 µM	0.5 µM	2,5 µl	2,5 µl
Template DNA	40 ng/µl	0,8 ng/µl	1 µl	0 µl
OneTaq Master Mix	2 X	1 X	25 µl	25 µl
Nukleasefreies Wasser		ad 50 µl	19 µl	20 µl

PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer
Anfängliche Denaturierung	94 °C	30 s
10 Zyklen	94 °C	30 s
	59 °C	30 s
	68 °C	1 min
	94 °C	30 s
25 Zyklen	64 °C	30 s
	68 °C	1 min
	94 °C	30 s
Finale Elongation	68 °C	5 min
	4 °C	

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgt wie in der Vorwoche (Protokoll Basiskurs S. 7).

PCR-Aufreinigung

Diese Methode dient dazu, das fertige PCR-Produkt von den übrigen Bestandteilen des PCR-Ansatzes (Enzym, Salze, Primer, ...) zu trennen, da diese den folgenden Restriktionsverdau stören. Bei der Aufreinigung wird die DNA zunächst mit einem Bindepuffer (hohe Salzkonzentration) auf eine Silikasäule geladen, anschließend mit einer Waschlösung (in Ethanol) von Kontaminationen gereinigt und letztlich mit einem Elutionspuffer bzw. Wasser (niedrige Salzkonzentration) eluiert.

Durchführung

1. Die PCR-Probe wird mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB versetzt, d. h. zu den beiden PCRs von insgesamt je 50 µl werden je 250 µl Puffer PB hinzugefügt (gut mischen!). Dieser Ansatz wird auf die Säule geladen, welche zuvor in ein entsprechendes Reaktionsgefäß gesteckt wurde.
2. Zentrifugation: 30 s bei 8 000 rpm.
3. Durchlauf verwerfen. 750 µl Puffer PB auf die Säule laden.
4. Zentrifugation: 30 s bei 8 000 rpm.
5. Durchlauf verwerfen. 750 µl Waschlösung PE auf die Säule laden.
6. Zentrifugation: 30 s bei 8 000 rpm.
7. Durchlauf verwerfen. Zentrifugation: 1 min bei 13 000 rpm.
8. Die Säule wird in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesteckt (der Deckel bleibt offen) und mit 50 µl H₂O beladen. Bitte darauf achten, das Wasser nicht an den Rand der Säule, sondern direkt auf die weiße Silikamatrix zu pipettieren! Eine Minute warten, damit sich die DNA im Wasser löst.
9. Zentrifugation: 1 min bei 10 000 rpm.
10. Die Säule wird verworfen und das Eluat mit der gereinigten DNA aufbewahrt.

Spektroskopische Messung der DNA-Konzentration

Bei der spektroskopischen Konzentrationsmessung wird die Probe von Licht im UV-Bereich durchstrahlt. Die Nukleobasen in der DNA absorbieren Licht bei 260 nm, während Proteine bei 280 nm absorbieren. Sehr viele Verunreinigungen absorbieren bei 230 nm. Misst man die Abschwächung der Lichtintensität bei diesen Wellenlängen, lässt sich daraus die Konzentration der DNA und der Reinheitsgrad bestimmen. Geräte des Typs NanoDrop kommen dabei mit sehr geringen Volumina (1 µl bis 3 µl) aus. Die Messung wird unter Anleitung der Mentoren durchgeführt.

Golden Gate Assembly

Die Golden-Gate-Klonierungsmethode ist eine moderne Strategie zum Erzeugen komplexer DNA-Konstrukte, die auf Restriktionsenzymen des Typs IIS basiert. Diese erkennen, wie „klassische“ Typ-II-Enzyme, eine bestimmte DNA-Sequenz. Im Gegensatz zu diesen schneiden sie jedoch nicht innerhalb ihrer Erkennungssequenz, sondern an einer genau definierten Position außerhalb. Das von uns verwendete Enzym BsaI hat bspw. folgendes Schnittschema:

```
NNNNGGTCTC>NNNNNNNNN
NNNNCCAGAG>NNNNNNNNN
```

Die Erkennungssequenz ist grün hinterlegt und die Schnittstelle durch rote Linien markiert. N steht

hier für ein beliebiges Nukleotid. Auf diese Weise kann man also DNA designen, welche nach einem Verdau durch ein solches Enzym einen selbst gewählten Überhang hat. Außerdem schneidet das Enzym seine eigene Erkennungssequenz aus der DNA heraus. Sobald das Zielplasmid ligiert wurde, enthält es daher keine BsaI-Erkennungssequenzen mehr, sondern nur noch die Sequenzen der Überhänge. Man kann deswegen Verdau und Ligation im gleichen Schritt durchführen. Eventuell noch vorhandenes unverdautes Plasmid enthält das Gen *ccdB*, welches für die meisten Bakterienstämme toxisch ist. Somit kann man davon ausgehen, dass fast 100 % der Bakterien, die nach der Transformation wachsen, das korrekte Plasmid beinhalten, und direkt nach der Transformation eine Flüssigkultur animpfen.

Durchführung

Komponente	Anfangs-konzentration	End-konzentration	GFP-Konstrukt	Positiv-kontrolle	Negativ-kontrolle
Vektor	350 ng/μl	10 ng/μl	0,43 μl	0,43 μl	0,43 μl
PCR-Produkt	... ng/μl	2,4 ng/μl	... μl	0 μl	0 μl
Null-Konstrukt	30 pmol/μl	15 pmol/μl	0 μl	7,5 μl	0 μl
T4 Ligase Buffer	10 X	1 X	1,5 μl	1,5 μl	1,5 μl
Bovines Serumalbumin	100 X	1 X	0,15 μl	0,15 μl	0,15 μl
BsaI			1 μl	1 μl	1 μl
T4-DNA-Ligase	2000 CELU/μl		1 μl	1 μl	1 μl
Nukleasefreies Wasser		ad 15 μl	... μl	3,42 μl	10,92 μl

Die Ansätze der Hälfte der Gruppe werden für 1 h bei 37 °C inkubiert; die andere Hälfte wechselt 15 mal alle 2 min die Temperatur zwischen 37 °C (Temperaturoptimum von BsaI) und 16 °C (Temperaturoptimum der T4-DNA-Ligase). Anschließend werden die Enzyme in beiden Fällen für je 5 min bei 50 °C und 80 °C inaktiviert. Dann wird noch je 1 μl DNA-Ligase (400 CELU/μl) zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Transformation in kompetente *E. coli* BL21(DE3)

Die Transformation in kompetente *E. coli* BL21(DE3) erfolgt wie in der Vorwoche (Protokoll Basiskurs S. 8). Alle drei klonierten Ansätze werden transformiert:

1. GFP-Konstrukt
2. Negativkontrolle
3. Positivkontrolle

Die transformierten Bakterien werden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Zusätzlich werden LB-Flüssigkulturen mit Ampicillin angeimpft.

Tag 2

Animpfen der Hauptkultur

Für die Proteinexpression wird die Übernachtskultur 1:10 verdünnt und eine Stunde wachsen gelassen. Das Gen für das zu exprimierende Protein wird bis dahin noch nicht abgelesen, da es (bzw. die dafür zuständige RNA-Polymerase) erst induziert werden muss. Daher wird nach einer Stunde die Kultur mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) der Konzentration 1 mM versetzt. Es sorgt dafür, dass die T7-RNA-Polymerase und somit das eigene Protein innerhalb der nächsten Stunden

exprimiert werden.

Die Hauptkulturen für dieses Experiment haben ein Gesamtvolumen von 3 ml und werden mit 300 µl der Flüssigkultur vom Vortag angeimpft.

Colony PCR

Die Colony PCR funktioniert wie eine herkömmliche PCR. Man benutzt sie aber als schnelles Nachweisverfahren, um zu prüfen, ob Bakterienkolonien, die aus einer Transformation hervorgegangen sind, tatsächlich das gewünschte Konstrukt enthalten. Dazu benötigt man keine aufgereinigte DNA, sondern suspendiert die ganzen Kolonien einzeln in 10 µl bis 20 µl Wasser und verwendet sie direkt in der PCR. Beim anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C setzen die Zellen genug Plasmid-DNA frei, um die PCR durchzuführen. Die Länge des Amplikons wird auf einem Agarosegel abgeschätzt und mit der erwarteten Länge verglichen. Die verwendeten Primer sollten außerhalb der eingesetzten Sequenz liegen, damit man nicht nur prüfen kann, ob sie vorhanden ist, sondern auch an der richtigen Stelle.

Pipettierschema

Komponente	Anfangs-konzentration	End-konzentration	Pro Kolonie	Negativ-kontrolle
Forward Primer: VF2	10 µM	0,5 µM	1,25 µl	1,25 µl
Reverse Primer: VR	10 µM	0,5 µM	1,25 µl	1,25 µl
Bakteriensuspension			1 µl	0 µl
OneTaq Master Mix	2 X	1 X	12,5 µl	12,5 µl
Nukleasefreies Wasser		ad 25 µl	9 µl	10 µl

PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer
Anfängliche Denaturierung	94 °C	30 s
	94 °C	30 s
30 Zyklen	51 °C	45 s
	68 °C	1 min
Finale Elongation	68 °C	5 min
	4 °C	

Immunoblot

Der Immunoblot, auch Western blot genannt, dient der spezifischen Detektion eines bestimmten Proteins. Vor dem Immunoblot werden die zellulären Proteine durch eine SDS-PAGE (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu werden die Bakterienzellen zunächst durch Hitze und das Detergens SDS lysiert, um die zellulären Proteine freizusetzen. Dabei bindet SDS wie eine Hülle an alle Proteine und überdeckt deren Eigenladung, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit Protein entstehen (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein). Durch die so entstandene einheitlich negative Oberflächenladung können die Proteine durch Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden können.

Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem (diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli, 1970). Hierbei durchlaufen die Proteine zunächst ein großporiges Sammelgel, welches ein engporige Trenngel überschichtet. Durch den sog. „Stacking effect“ im Sammelgel, sowie durch den hohen Reibungswiderstand beim Übergang vom Sammel- zum

Trenngel, wird die Bandenschärfe im Vergleich zu einer kontinuierlichen Elektrophorese erhöht.

Im anschließenden Blot werden die Proteine in einem senkrecht zum SDS-Gel angelegten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membran wird, nach einer Inkubation in Milchpulverlösung zum Abblocken unspezifischer Bindungen, mit zwei Antikörpern behandelt. Der Erst-Antikörper bindet spezifisch an eine Stelle des grün fluoreszierenden Proteins. Der Zweit-Antikörper bindet an den Erst-Antikörper und ist an das Enzym „Horseradish Peroxidase“ gekoppelt. Dieses Enzym kann ein Substrat so umsetzen, dass es zu leuchten beginnt. Die dadurch sichtbar werdenden Proteinbanden entsprechen der Position des GFP im Gel, was eine Abschätzung der Proteingröße durch Vergleich mit einem Größenmarker erlaubt. Zu beachten ist, dass die durch SDS-PAGE bestimmte Masse, je nach Struktur und Ladung des Proteins, vom errechneten Molekulargewicht abweichen kann, weshalb man oft vom scheinbaren Molekulargewicht (*apparent molecular weight*) spricht.

Lyse der Bakteriensuspension

Jeder Teilnehmer hat zwei Proben: zirkuläres und lineares GFP!

1. 1 ml Bakteriensuspension wird abzentrifugiert (5 min bei 8000 rpm) und das Zellpellet in 300 µl 1X Laemmli-Puffer aufgenommen.
2. Inkubation bei 99 °C für 5 min.
3. 5 µl Proteinmarker in die erste Tasche des Gels geben
4. 30 µl jeder Probe auf das Gel laden.

Vorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE wie in der Vorwoche (Protokoll Basiskurs S. 23 und 24).

Jeder Teilnehmer trägt seine zwei Proben auf zwei Gelen verschiedener Konzentration (10- und 15-prozentiges Trenngel) auf.

Transfer der Proteine durch Semi-Dry-Elektroblot

1. Transferpuffer, Blottingpapiere und PVDF-Membran (immer Handschuhe tragen!) vorbereiten.
2. Platten aus der Kammer ausspannen, mittels eines Spatels vorsichtig öffnen.
3. Sammelgel vorsichtig entfernen und werfen; Trenngel auf der Glasscheibe belassen.
4. 3 Blottingpapiere mit Transferpuffer befeuchten und als Stapel auf den Semi-Dry-Blotter legen.
5. PVDF-Membran mit Methanol aktivieren und in Transferpuffer legen, danach Membran auf das Trenngel legen.
6. Trenngel von der Glasplatte lösen, sodass die membranbedeckte Seite auf den Stapel der Blottingpapiere rutscht.
7. 3 weitere Blottingpapiere mit Transferpuffer befeuchtet auf das Gel auflegen.
8. Luftblasen mit einem geeigneten walzenartigen Hilfsmittel von der Mitte beginnend nach beiden Seiten rausrollen.
9. Deckel des Semi-Dry-Blotters mit Transferpuffer befeuchten und auflegen.
10. Stromquelle anschließen und pro cm² Membranfläche 1 mA Spannung anlegen (Volt nicht begrenzen, es sollen zu Beginn 4 – 8 Volt anliegen, später leicht ansteigend). Die Transferzeit beträgt 1 h bis 1,5 h.

11. Semi-Dry-Blot wieder abbauen und Membran vorsichtig entfernen (wurde der Marker übertragen?) und für 1 h bis 18 h mit 5 % Milchpulver in PBS-T (Blocking-Lösung) über Nacht unter Schütteln bei 4 °C inkubieren.

Tag 3

Nachweis der Proteine durch Antikörper

Alle weiteren Schritte erfolgen unter Schütteln bei Raumtemperatur.

1. Membran aus der Blocking-Lösung nehmen und mit PBS-T wie folgt waschen:
 1. 2 mal 10 s
 2. 2 mal 5 min
2. Membran mit Erstantikörper-Lösung (anti-FLAG oder anti-His nach Angabe der Mentoren) für 1 h inkubieren.
3. Mit PBS-T wie in Schritt 1 waschen.
4. Membran mit Zweitantikörper-Lösung (anti-Maus) für 0,5 h bis 1 h inkubieren.
5. Mit PBS-T wie in Schritt 1 waschen.
6. Membran mit Detektionslösung inkubieren und mit Chemilumineszenz-Kamera fotografieren.